联合诱导法对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶系的影响*

汪希兰，谢金才，王翠芬
（贵州医科大学 公共卫生学院学生综合实验室，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：观察苯巴比妥钠（PB）与 β-萘黄酮（β-NF）联合应用对大鼠肝微粒体细胞色素 P450（CYP450）酶系的影响。**方法**：16 只 SD 雄性大鼠随机分为实验组和对照组，实验组腹腔注射 PB 和 β-NF，对照组给予等量生理盐水，连续 4d 后取各组大鼠肝脏组织制备肝微粒体；测定肝脏脏器系数，采用 Lowry 法测定肝微粒体蛋白含量，分光光度法检测 CYP450、细胞色素 b5（Cytb5）含量和 CYP3A 活性，荧光分光光度法测定 CYP1A2 活性。**结果**：PB 与 β-NF 联合应用后，大鼠肝脏脏器系数，肝微粒体蛋白含量、CYP450、Cytb5 含量及 CYP1A2、CYP3A 活性较对照组均有增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**：PB 和 β-NF 腹腔注射对大鼠肝微粒体 CYP450 酶系有较强的诱导效应。

［关键词］苯巴比妥钠；β-萘黄酮；微粒体，肝；细胞色素 P-450 酶系统
［中图分类号］R345 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2016）10-1189-04
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.10.016

Effects of the Combined Induction of Phenobarbital and β-naphthoflavone on Liver Microsomal Cytochrome P450 in Rats

WANG Xilan, XIE Jincai, WANG Cuifen
(*School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To observe the effects of combined induction of phenobarbital and β-naphthoflavone on liver microsomal cytochrome P450 in rats. **Methods**: 16 male SD rats were randomly divided into 2 groups, the experimental group in which each animal was intraperitoneally injected with phenobarbital and β-naphthoflavone, and the control group in which each animal received equal volume of saline. After this treatment for 4 days successively, the liver microsomes were prepared and liver/body weight ratios were detected. The contents of protein in liver microsomes were measured by Lowry method. Spectrophotometric was adopted to determine the contents of CYP450, cytochrome b5 (cytb5) content and CYP3A activity, and the CYP1A2 activity was determined by fluorescence spectrophotometry. **Results**: After combined induction of phenobarbital and β-naphthoflavone, the liver organ coefficient, liver microsomal protein content, CYP450, cytb5 content and CYP3A activity in the rat liver were increased compared with the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion**: The combination of phenobarbital and β-naphthoflavone has a strong induction effect to CYP450 of liver microsomes in rats.

［**Key words**］phenobarbital; β-naphthoflavone; microsomes, liver; cytochrome P450

肝微粒体是将肝组织匀浆离心后得到的肝亚细胞成分，主要有效成分为混合功能氧化酶（MFO），细胞色素 P450（cytochrome，CYP450）酶系是 MFO 中最重要的一种氧化酶，包括 14 个家族，26 个亚家族，50 多种具有催化功能的亚型，在外源及内源物质的生物转化过程中发挥着至关重

*［基金项目］贵州医科大学青年基金资助项目（K2010－5）
网络出版时间：2016－10－17 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20161017.1445.012.html

要的作用,与毒物、致癌物或药物的代谢活化密切相关[1-2],因此该酶系常采用诱导剂诱导制备,作为体外试验研究中的重要酶代谢系统,广泛应用于毒理学、环境医学和药理学研究[3-4]。苯巴比妥钠(PB)和 β-萘黄酮(β-NF)是常用的诱导剂,但它们对 CYP450 酶含量的影响报道不一,所诱导的酶亚型类别也有差异[5]。本文采用 PB 和 β-NF 联合作用诱导制备大鼠肝微粒体,分析此方法对肝 CYP450、Cytb5 含量及主要亚酶 CYP1A2、CYP3A 活性的影响,旨在为体外代谢试验选择合适的诱导剂及诱导方法提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　主要仪器及试剂

T6 新世纪紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、超级酶标仪(美国分子公司)、荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司)、全自动低温高速离心机(北京时代北利离心机有限公司),PB(贵州光正制药有限责任公司)、β-NF(北京伊诺凯科技有限公司)、Lowry 法蛋白含量测定试剂盒(上海荔达生物科技有限公司),甲氧基异噁唑(MF)、异噁唑(Resorufin)、红霉素、氧化型辅酶Ⅱ(NADP)、6-磷酸葡萄糖二钠和葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(均为 Sigma 公司产品)。

1.2　动物分组及肝微粒体酶诱导

健康雄性 SD 大鼠 16 只,体质量(200 ± 20)g,由贵州医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黔)2012 - 0001。将大鼠随机分为实验组与对照组,每组 8 只。实验组:用生理盐水配制 PB,玉米油溶解配制 β-NF;第 1 天对大鼠腹腔注射 PB 30 mg/kg,第 2、3、4 天再各注射双倍剂量(60 mg/kg)的 PB,并于第 3、4 天增加注射 β-NF 80 mg/kg。对照组:大鼠腹腔注射等量的生理盐水,1 次/d,连续 4 d。

1.3　肝微粒体酶制备

各组大鼠第 5 天断头处死(处死前 12 h 禁食),放血,取出肝脏,用新鲜预冷的 0.15 mol/L 氯化钾溶液冲洗表面血污,称肝重。将肝脏剪碎,每克肝加 0.15 mol/L 氯化钾溶液 3 mL,制成肝匀浆,9 000 g 离心 10 min(以上操作均在 4 ℃下操作)。吸弃白色脂肪层,取上清液即为肝微粒体酶,分装于无菌冻存管中,速冻后置 - 80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.4　肝微粒体蛋白含量测定

按照 Lowry 法蛋白质定量试剂盒说明,配制牛血清白蛋白标准溶液和工作液,用酶标仪在 750 nm 波长测定各浓度标准液的光吸收度(*OD* 值),绘制标准曲线。将待测大鼠肝微粒体样本稀释 100 倍,依据标准曲线操作步骤测定并计算待测样本中蛋白含量。

1.5　CYP450 和 Cytb5 含量测定

CYP450 含量的测定采用 CO 还原差示光谱法[6]。取微粒体悬液 0.3 mL,0.1 mol/L PBS 缓冲液(PH = 7.4)5.7 mL 加至试管中,加入 0.1 g/mL 连二亚硫酸钠 40 μL,立即混匀,静置 2 min,等量分装到 2 个比色杯中,分别作为对照和样本,向样本池缓慢通入 CO 60 s,稳定 2 min;以对照杯调零,紫外分光光度计从 400 nm 向 500 nm 扫描,通过比较 450 nm 和 490 nm 波长下的 *OD* 值来计算 CYP450 的含量。计算公式为:

$$\text{CYP450 含量}(\mu\text{mol/g}) = \frac{(OD_{450} - OD_{490}) \times \text{样本的稀释倍数}}{0.091 \times \text{样品的蛋白质浓度}(\text{g/L})}$$

Cytb5 含量测定采用差示光谱法测定[6],除不进行 CO 充气外,其余步骤与细胞色素 P450 含量测定方法相同,通过比较 424 nm 和 490 nm 波长下的 *OD* 值来计算细胞色素 Cytb5 含量。计算公式为:

$$\text{Cytb5 含量}(\mu\text{moL/g}) = \frac{(OD_{424} - OD_{490}) \times \text{样本的稀释倍数}}{0.171 \times \text{样品的蛋白质浓度}(\text{g/L})}$$

1.6　CYP1A2 活性测定

参照文献[7-8]的方法,CYP1A2 活性可用甲氧基异噁唑脱甲基酶(MROD)活性反映,根据 MROD 单位时间内催化甲氧基异噁唑(methoxyresorufin,MF)生成异噁唑(resorufin)的量来特异性地反应相应酶的活性。以 resorufin 为标准品,MF 为底物,NADPH 生成体系启动反应,用荧光分光光度计测定肝微粒体悬液荧光强度的变化,激发波长和发射波长分别为 EX = 530 nm、EM = 585 nm。计算所得 resorufin 含量,即代表酶活性,酶活力单位以 μmol/(g · min)表示。

1.7　CYP3A 活性测定

按文献[8]方法,采用 Nash 比色法测定。红霉素作为 CYP3A 的底物,由 CYP3A 介导的红霉素 N-脱甲基反应与 CYP3A 酶活性具有相关性,因此红霉素 N-脱甲基酶(ERND)活性即可代表 CYP3A

的酶活性。以不同浓度甲醛系列标准液作为横坐标,OD 值为纵坐标绘制标准曲线。通过检测待测微粒体样品所得到的甲醛产量计算 ERND(CYP3A)活性,酶活力单位以 μmol/(g·min)表示。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,组间比较采用独立样本 t 检验,数据用均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示。检验水准 $a = 0.05$。

2 结果

2.1 肝微粒体蛋白含量

大鼠肝脏系数(脏器重/体重×100)高于对照组($P < 0.05$)。按照 lowry 法,以蛋白浓度对吸收度进行线性回归,得到蛋白浓度测定的标准曲线为 $Y = 0.182\ 5X - 0.002\ 0$, 相关系数 $r = 0.999\ 1$,线性关系良好。通过比较待测样品肝微粒体蛋白含量,实验组肝微粒体蛋白含量较对照组增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1　两组大鼠肝脏系数及肝微粒体蛋白含量检测结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 1　The contents of liver microsomal protein in rats

组别	肝脏系数	微粒体蛋白含量(g/L)
对照组	3.362 ± 0.616	35.413 ± 3.916
实验组	4.614 ± 0.325(1)	49.534 ± 4.379(1)

(1) 与对照组比较,$P < 0.05$

2.2 肝微粒体 CYP450、Cytb5 含量及 CYP1A2、CYP3A 活性

与对照组比较,PB 与 β-NF 联合用药后实验组大鼠肝微粒体 CYP P450、Cytb5 含量明显增加,CYP1A2、CYP3A 活性亦增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2　两组大鼠肝微粒体 CYP450、Cytb5 含量及 CYP1A2、CYP3A 活性($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 2　The contents and activities of cytochrome P450 system in rats liver microsome

指标	对照组	实验组
CYP450 含量(μmol/g)	0.327 ± 0.138	1.447 ± 0.360(1)
Cytb5 含量(μmol/g)	0.165 ± 0.047	0.850 ± 0.102(1)
CYP1A2 活性(μmol/g·min)	13.722 ± 1.991	29.197 ± 3.262(1)
CYP3A 活性(μmol/g·min)	0.417 ± 0.056	2.361 ± 0.371(1)

(1) 与对照组比较,$P < 0.05$

3 讨论

CYP450 酶作为体外试验研究中的重要酶代谢系统,是 MFO 的主要成分,在整个酶系中起到终末氧化酶的作用,具有活化氧分子和与底物结合的双重功能。Cytb5 是一个具有多种重要生理功能的低自旋金属蛋白,给 CYP450 系统提供电子,这一传递系统在内质网中可增强 CYP450 的氧化活性,参与 P450 酶的代谢过程[9-10]。

PB 和 β-NF 可以促进肝脏内质网增生和微粒体膜结合蛋白合成,尤其是诱导 CYP450 合成的增加,而对 CYP450 诱导作用常常伴随着肝脏重量和微粒体蛋白含量的增加[11]。本实验研究了 PB 和 β-NF 联合作用对大鼠肝微粒体 CYP450 酶系的影响,结果表明,大鼠肝脏系数及微粒体蛋白含量明显高于对照组,提示两者联合作用可促进肝细胞内质网增生和蛋白质合成。酶的催化活性取决于酶的含量水平,根据 CYP450 和 Cytb5 含量的变化可初步推断酶活性是被诱导或抑制。大鼠肝 CYP450 及 Cytb5 含量升高,说明两种物质结合可诱导大鼠肝微粒体酶,提高该酶系活性。

CYP1、CYP2 和 CYP3 是 CYP450 酶系中参与内源性物质和外源性物质(包括药物和环境污染物)代谢的的主要家族。CYP1 型酶主要参与多环芳烃和芳香胺类化合物代谢,其中 CYP1A 亚家族包括 CYP1A1 和 CYP1A2,CYP1A1 主要表达于皮肤、肾、肺等肝外组织;CYP1A2 在肝组织中特异性表达,占肝细胞色素酶总量的 13%,居肝脏各 CYP450 酶含量的第 3 位,是重要的 CYP450 氧化酶之一,其活性与许多药物的疗效或毒性相关,并参与多种与癌症发生密切相关的化学性毒物(如亚硝胺)和内源性激素的代谢[12-13]。CYP3A 是 CYP450 中最重要的部分,约占 CYP450 酶系总量的 30%,主要参与 50% 以上药物的代谢及部分前致癌物的活化[14-15],因此,两种主要 CYP450 亚酶在内外源性物质代谢研究中具有重要作用。对其检测发现,CYP1A2 和 CYP3A 活性明显升高,进一步表明了 PB 和 β-NF 联合作用对 CYP450 酶具有明显的诱导效应。

细胞色素 P450 酶系在人体肝脏生物转化中发挥重要作用,由于人体肝脏的不易获得,哺乳动物如大鼠肝脏微粒体 P450 酶系常用于体外代谢试验,因而采用诱导法增加该酶系的含量及活性十

分必要。本文采用 PB 和 β-NF 作为联合诱导剂有助于毒物、致癌物及药物等外源化合物的毒理、药理作用机制的研究，为体外代谢研究提供相关基础数据及一定的参考依据。

4　参考文献

[1] 朱加银，王贤亲，朱仔花，等. 肝硬化模型大鼠 CYP2B6 和 CYP3A 酶活性变化[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2014(1)：81－87.

[2] Walsh JS, Miwa GT. Bioactivation of drugs: risk and drug design[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2011(1)：145－167.

[3] 李丹，韩永龙，余涛，等. 体外肝代谢模型的优缺点及其应用[J]. 中国临床药理学与治疗学，2011(6)：688－694.

[4] 胡东华，王宇光，陈志武，等. 复方丹参滴丸对大鼠肝细胞色素 P450 酶的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2013(4)：678－684.

[5] 严敏芬，郝福荣，许立明，等. 大鼠肝微粒体 CYP2B1 的活性和 P450 含量的变化[J]. 复旦学报：医学版，2006(4)：513－516.

[6] 徐叔云，卞如谦，陈修. 药理实验方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001：511.

[7] Weaver RJ, Thompson S, Smith G, et al. A comparative study of constitutive and induced alkoxyresorufin O-dealkylation and individual cytochrome P450 forms in cynomolgus monkey (Macaca fascicularis), human, mouse, rat and hamster liver microsomes[J]. Biochem Pharmacol, 1994(5)：763－773.

[8] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1998：1642－1652.

[9] Cederbaum AI. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications[J]. Redox Biology, 2015(4)：60－73.

[10] 王青秀，雷荣辉，吴纯启，等. 大黄素对大鼠肝脏 CYP450 酶的诱导研究[J]. 药物评价研究，2015(2)：147－150.

[11] 杨海峰，张玲玲，覃少华，等. 苯巴比妥和地塞米松对鸡细胞色素 P450 的诱导作用[J]. 西北农林科技大学学报：自然科学版，2007(5)：69－72.

[12] 姜英，陈曦，饶凯敏，等. 苯并(a)芘对 H 1299 细胞 CYP1A1 酶活力和相关基因表达的影响[J]. 毒理学杂志，2010(4)：253 － 256.

[13] 白燕，冯素香，周悌强，等. 探针药物评价大黄苷元对 P450 酶 CYP1A2 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2015(5)：143－146.

[14] Smith RP, Eckalbar WL, Morrissey KM, et al. Genome-wide discovery of drug-dependent human liver regulatory elements[J]. PLoS Genetics, 2014(10)：1－11.

[15] 王筑婷，李红梅，雷霆雯. 都匀毛尖对小鼠肝脏 CYP3A 酶活性及其 mRNA 水平的影响[J]. 贵阳医学院学报，2015 (5)：471－474.

(2016-08-17 收稿，2016-09-23 修回)
中文编辑：刘　平；英文编辑：刘　华

(上接第 1188 页)

[3] 秦树森. 抗炎镇痛作用中药在治疗类风湿关节炎中的应用进展[J]. 中国卫生产业，2014(19)：197－198.

[4] 陶玲，支娜，柏帅，等. 大蝎子草抗炎镇痛活性部位研究[J]. 时珍国医国药，2009(6)：1404－1405.

[5] 沈祥春，支娜，许立，等. 大蝎子草乙酸乙酯部位对脂多糖诱导巨噬细胞炎症介质表达的影响[J]. 中华中医药杂志，2010(9)：1397－1400.

[6] 支娜，陶玲，沈祥春. 大蝎子草水层部位对诱导大鼠腹腔巨噬细胞 iNOS 与 TNF-α 的影响[J]. 中药药理与临床，2010(3)：39－41.

[7] 徐旖旎，姜丰，李守巧，等. 正交试验法优选大蝎子草总黄酮提取工艺[J]. 贵阳医学院学报，2016(1)：41－44.

[8] 李桂兰，贺智勇，薛雨晨，等. 闪式提取法用于大蝎子草总黄酮的工艺条件研究[J]. 中成药，2015(7)：1603－1605.

[9] 郑亚男，杜文杰，尹雪霏，等. 独一味不同有效部位抗炎镇痛作用比较[J]. 时珍国医国药，2015(2)：282－284.

[10] 潘琼，徐力生，严建依，等. 甘草甜素抗炎镇痛作用的研究[J]. 时珍国医国药，2013(4)：827－828.

[11] 王梦溪，吴启南，乐巍，等. 中药鲜药的应用与现代研究[J]. 中草药，2015(20)：3125－3130.

[12] 张晓菊. 鲜品中药临床应用优势及其影响因素[J]. 中国中医药咨讯，2011(16)：153.

(2016-06-07 收稿，2016-09-21 修回)
中文编辑：刘　平；英文编辑：赵　毅